



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química
Projeto Final de Curso



Utilização de corantes naturais como indicadores de pH em papel.

Thiago Cescon de Almeida Gomes

Orientador:

Prof. Dr. Rodolfo Santos Barboza (DQA-IQ-UFRJ)

Rio de Janeiro
Julho de 2018.

Thiago Cescon de Almeida Gomes

Utilização de corantes naturais como indicadores
de pH em papel.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Bacharel em Química.

Rio de Janeiro
Julho de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

G633u Gomes, Thiago Cescon de Almeida
Utilização de corantes naturais como indicadores
de pH em papel / Thiago Cescon de Almeida Gomes. --
Rio de Janeiro, 2018.
45 f.

Orientador: Rodolfo Santos Barboza.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Química, Bacharel em Química, 2018.

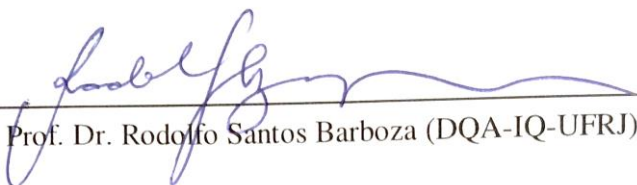
1. indicadores. 2. flavonoides. 3. pH. 4.
análise qualitativa. 5. corantes. I. Barboza,
Rodolfo Santos, orient. II. Título.

Thiago Cescon de Almeida Gomes

Utilização de corantes naturais como indicadores
de pH em papel.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Bacharel em Química.

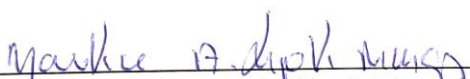
Aprovado por:



Prof. Dr. Rodolfo Santos Barboza (DQA-IQ-UFRJ)



Profª Drª Rosângela Sabbatini Capella Lopes (DQA-IQ-UFRJ)



Profª Drª Marlice Aparecida Sipoli Marques (DQA-IQ-UFRJ)

Rio de Janeiro
Julho de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais José Henrique e Jcione Cescon, por sempre acreditarem em mim, me guiando no caminho de minha escolha e reconfortando nos momentos de necessidade com amor e justiça, que a minha graduação seja um momento de orgulho em meio a outros que virão.

Agradeço às minhas irmãs Tais Cescon e Iris Cescon, que sempre serviram de exemplo e apoio nas horas difíceis, me ajudando a superar obstáculos e dificuldades.

À minha tia Jocinete Cescon, que me fez apaixonar pela ciência e leitura, sempre mostrando que inteligência e perseverança superam todos os obstáculos com ações mais do que palavras, agradeço a todas essas características que eu levo no coração.

Aos amigos e companheiros Geraldo Bessa, Brent Vasconcelos e Luciana Oliveira que me apoiaram com piadas, conselhos, risadas, carinho e compreensão, sempre me ajudando nos momentos em que mais precisei tanto no âmbito profissional quanto no pessoal, sem nenhum laço de sangue, vocês serviram como base para definir a amizade de coração.

Ao Dr. Rodolfo Santos Barboza, gostaria de expressar minha enorme gratidão tanto pelo exemplo de profissional e acadêmico que se tornou durante minha graduação, nas duas oportunidades em que tive o prazer de ser seu aluno, quanto pela constante presença, entusiasmo, apoio, paciência e amizade que demonstrou durante a orientação desse trabalho que foi extremamente essencial para a minha formação como profissional e cidadão.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, agradeço pela acolhida e oportunidade proporcionadas.

RESUMO

PROJETO DE CURSO – IQWX10

TÍTULO: UTILIZAÇÃO DE CORANTES NATURAIS COMO INDICADORES DE pH EM PAPEL.

ALUNO: Thiago Cescon de Almeida Gomes

ORIENTADOR: Prof. Rodolfo Santos Barboza, DQA – Instituto de Química – UFRJ

As substâncias indicadoras (visuais) são assim classificadas por apresentarem diferentes colorações em função do ambiente químico ao qual estão submetidas, sendo importantes parâmetros como: pH, potencial elétrico, complexação com íons metálicos e adsorção em sólidos (1). Indicadores de pH (ou ácido-base) são substâncias orgânicas conjugadas classificadas como ácidos ou bases fracas que apresentam diferentes cores para cada espécie relacionada (protonadas e ionizadas) (2). Algumas substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de diversas espécies de plantas, podem ser utilizadas como indicadores naturais de pH, sendo as mais comuns as antocianinas, pigmentos predominantes em plantas com flores, onde desempenham papéis importantes na polinização, dispersão de sementes, proteção contra estresse e sinalização (3) e (4). O menor impacto ambiental e o menor custo efetivo relacionado são as principais vantagens apontadas para a utilização de pigmentos naturais em substituição aos indicadores convencionais (4). Diante deste contexto, a utilização de extratos naturais como indicadores de pH mostra-se como alternativa potencial em métodos analíticos de qualificação/quantificação, desde a etapa de obtenção até a caracterização visual e/ou espectrofotométrica das diferentes formas coloridas que aparecem em função das mudanças de pH do meio. O presente projeto objetivou o desenvolvimento de um *kit* alternativo para medidas de pH de soluções, construído a partir de material de fácil acesso e baixo custo e baseado na utilização dos pigmentos naturais encontrados em vegetais comuns no Brasil como indicadores naturais. Para tanto, verificou-se a viabilidade de utilização dos pigmentos presentes nos extratos de repolho roxo, beterraba e flores de hibisco. O estudo foi delineado de modo a definir as matrizes vegetais mais adequadas para a determinação do pH de soluções, além das melhores formas de extração, armazenamento e utilização dos indicadores naturais. Dentre os métodos utilizados, a impregnação em papel de filtro através da compressão do material vegetal macerado e hidratado foi a escolhida para confecção de papéis indicadores, cujo prazo de validade foi estimado em até 15 dias por densitometria computacional. O *kit* proposto foi construído pelos referidos papéis indicadores, blisters de medicamento reciclados e escalas de cores em função do pH (em solução e em papel).

(1) TERCI & ROSSI. Química Nova. 25, 4, 648-688, 2002.

(2) BACCAN et al. Química Analítica Quantitativa Elementar, 2ª ed., Ed. Unicamp: Campinas, 46, 1979.

(3) HAVSTEEN. Pharmacology & Therapeutics, 96, 167-202, 2002.

(4) GUIMARÃES et al. Química Nova, 3, 8, 1673-1679, 2012.

Sumário Geral

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
1. Introdução.....	11
1.1 Flavonoides: antocianinas e suas propriedades	11
1.2 Alcaloides: betalaínas e suas propriedades	16
1.3 Utilização dos corantes naturais como indicadores de pH.....	18
2. Objetivo.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. Material e Métodos	20
3.1 Equipamentos	20
3.2 Reagentes e soluções	20
3.3 Material vegetal.....	20
3.4 Extração dos pigmentos naturais e impregnação em papel de filtro	20
3.5 Viabilidade de utilização das matrizes vegetais estudadas como indicadores naturais de pH	21
3.6 Estabilidade dos papéis indicadores (densitometria computacional)	21
3.7 Construção da escala de cores em função do pH.....	22
3.8 Validação do método desenvolvido para medidas de pH	22
4. Resultados e Discussão	23
4.1 Determinação do método de impregnação dos pigmentos em papel de filtro	23
4.2 Viabilidade de utilização dos extratos vegetais como indicadores de pH	23
4.3 Estudo de estabilidade por análise densitométrica	25
4.4 Construção da escala de cores em função do pH	28
4.5 Confecção do <i>kit</i> alternativo medidor de pH e protocolo de utilização.....	29
4.6 Estudo prático de utilização do <i>kit</i> medidor de pH - Teste cego.....	31
4.7 Possibilidades de aplicação do <i>kit</i> alternativo medidor de pH.....	32
5. Conclusão	33
6. Perspectivas	34
7. Referências bibliográficas	35
Anexo A - Resultados da análise densitométrica	37
Anexo B – Análise estatística.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo básico dos flavonoides.	12
Figura 2. Estruturada básica do cátion <i>flavilium</i>	12
Figura 3. Estrutura genérica das antocianidinas e suas variações.	14
Figura 4. Possíveis mudanças estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH. Adaptado de (TERCI & ROSSI, 2002).	15
Figura 5. Estrutura geral das betacianinas vermelhas (R e R1 = H ou Glc) e das betaxantinas amarelas (R2 e R3 são grupos característicos de aminoácidos). Estrutura do ácido betalâmico, o precursor comum a todas as betalaínas, e exemplos encontrados na natureza. Adaptado de (GONÇALVES <i>et al.</i> , 2015).	17
Figura 6. Papéis indicadores produzidos a partir do extrato de repolho roxo, através dos procedimentos de: (a). Banho; (b). Borrifamento e; (c). Compressão.	23
Figura 7. Avaliação qualitativa dos possíveis indicadores naturais utilizados.	24
Figura 8. Esquema representativo da análise densitométrica.	26
Figura 9. Análise densitométrica dos papéis indicadores produzidos com os pigmentos de beterraba, flor de hibisco e repolho roxo durante o período de 15 dias. A. Antes e; B. Após a aplicação de solução pH 1.	27
Figura 10. Escala de cores em solução em função do pH (pH 1-13). Papel de filtro impregnado com extrato de R - repolho roxo; B- beterraba; H- flor de hibisco.	29
Figura 11. Escala de cores em papel em função do pH (pH 1-13). Papel de filtro impregnado com extrato de R - repolho roxo; B – beterraba; e H – flor de hibisco.	29
Figura 12. Conteúdo do <i>kit</i> medidor de pH.	30
Figura B1. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados da beterraba.	43
Figura B2. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados da flor de hibisco.	43

Figura B3. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados do repolho roxo44

Figura B4. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados da beterraba impregnados com pH 144

Figura B5. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados da flor de hibisco impregnados com pH 145

Figura B6. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados do repolho roxo impregnados com pH 145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Antocianinas frequentemente encontradas em vegetais (Adaptado de TERCI & ROSSI, 2002).....	13
Tabela 2. Resultados de pH nominais e exatos das soluções utilizadas na construção da escala de cores.	28
Tabela 3. Valores de pH encontrados para as soluções A, B e C, em “teste cego” através da utilização dos <i>kits</i> de pH alternativos.....	31
Tabela A1. Resultados para os papéis indicadores de beterraba durante o período de 15 dias	37
Tabela A2. Resultados para os papéis indicadores de flor de hibisco durante o período de 15 dias	38
Tabela A3. Resultados para os papéis indicadores de repolho durante o período de 15 dias	39
Tabela A4. Resultados para os papéis indicadores de beterraba durante o período de 15 dias (em solução pH 1).....	40
Tabela A5. Resultados para os papéis indicadores de flor de hibisco durante o período de 15 dias (em solução pH 1)	41
Tabela A6. Resultados para os papéis indicadores de repolho durante o período de 15 dias (em solução pH 1)	42

1. Introdução

As substâncias indicadoras (visuais) são assim classificadas por apresentarem diferentes colorações em função do ambiente químico ao qual estão submetidas, sendo importantes alguns parâmetros como: pH, potencial elétrico, complexação com íons metálicos e adsorção em sólidos (TERCI & ROSSI, 2002).

Indicadores de pH (ou ácido-base) são substâncias orgânicas conjugadas classificadas como ácidos ou bases fracos que apresentam diferentes cores para cada espécie relacionada (formas protonadas e ionizadas) (BACCAN, ANDRADE, GODINHO, & BARONE, 1979). Algumas substâncias produzidas pelo metabolismo secundário de diversas espécies de plantas, podem ser utilizadas como indicadores naturais de pH. Carotenoides e flavonoides, incluindo antocianinas, são os pigmentos predominantes em plantas com flores, onde desempenham papéis importantes na polinização, dispersão de sementes, proteção contra estresse e sinalização. Em certas famílias dentro das Pentapetalae ordem *Caryophyllales*, uma classe incomum de pigmentos, conhecida como betalaínas, alcaloides coloridos, substitui as antocianinas mais comuns (BROCKINGTON *et al.*, 2011).

1.1 Flavonoides: antocianinas e suas propriedades

Aos flavonoides são atribuídas diversas funções nas plantas. Entre elas podemos citar: (a) proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível; (b) proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; (c) atraente de animais com finalidade de polinização; (d) antioxidantes; (e) controle da ação de hormônios vegetais; e (f) agentes alelopáticos (MARIOT *et al.*, 2000).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, podendo se apresentar associados a glicosídeos. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídio. Quando o metabólito encontra-se sem o glicosídeo, é chamado de aglicona ou genina, sendo frequentemente denominada por forma livre. A estrutura é baseada no núcleo flavonoídico (**Figura 1, página 12**). Os flavonoides são subdivididos em subclasses de acordo com o nível de oxidação do anel C, as quais incluem as antocianinas, flavanóis (catequinas), flavonas, flavonóis, flavanonas e isoflavonas entre outras (HAVSTEEN, 1983; HAVSTEEN, 2002).

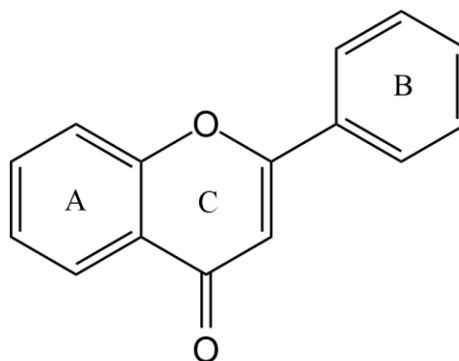


Figura 1. Núcleo básico dos flavonoides.

As antocianinas (do grego: *anthos* = flores; *kianos* = azul), pertencentes à classe dos flavonoides, são os pigmentos responsáveis pela coloração azul, violeta, vermelha e rosa exibida por flores e frutos (VERGARA *et al.*, 2009). As substâncias pertencentes à subclasse das antocianinas são derivadas da estrutura básica do cátion *flavilium* (**Figura 2**), deficiente em elétrons e, portanto, muito reativo (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

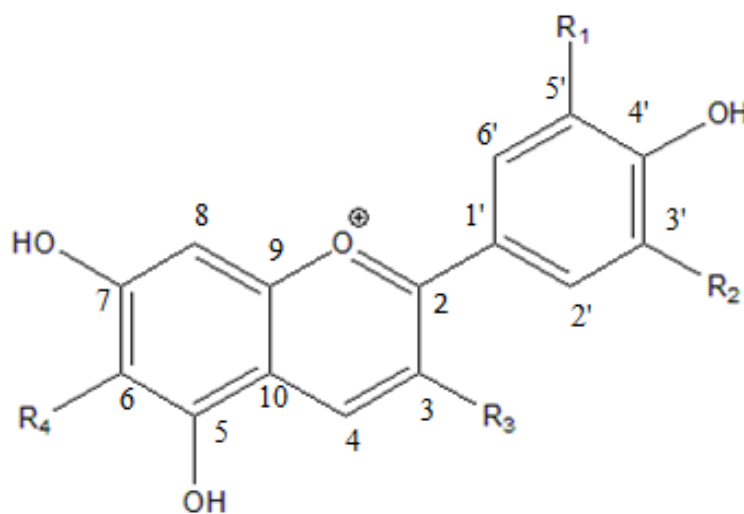


Figura 2. Estrutura básica do cátion *flavilium*.

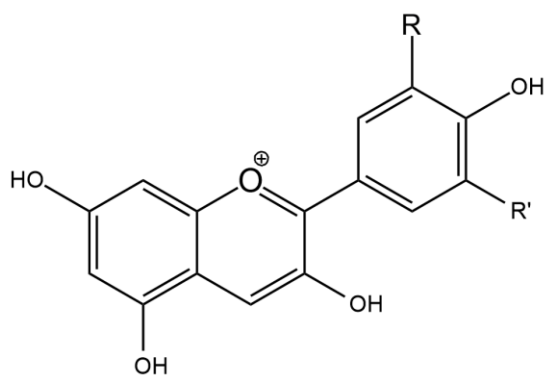
Uma vez que são derivadas das antocianidinas (não possuem associação com moléculas de açúcar), nas antocianinas, uma ou mais hidroxilas, geralmente nas posições 3, 5 e/ou 7, são substituídas por *O*-glicosídeos, aos quais podem ainda, estar ligados a ácidos fenólicos (**Figura 3, página 14**). Os diferentes grupos R e R' e açúcares ligados nas posições 3, 5 e/ou 7, assim como os ácidos a eles ligados, caracterizam os diferentes tipos de antocianinas, sendo que as mais comuns são apresentadas na **Tabela 1 (página 13)** (TIMBERLAKE *et al.*, 1975; TERCIO & ROSSI, 2002).

Tabela 1. Antocianinas frequentemente encontradas em vegetais (Adaptado de TERCİ & ROSSI, 2002).

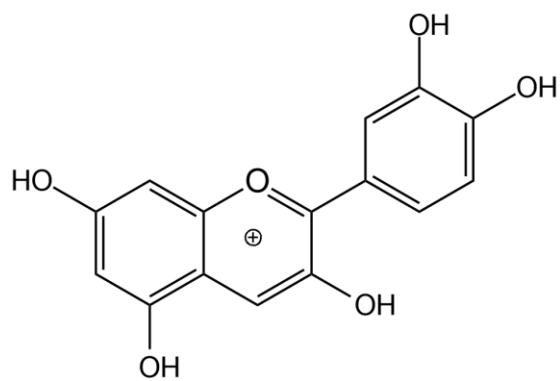
Antocianina	Fontes
Pelargonidina-3-glucosídeo	morangos
Cianidina-3-glucosídeo	morangos, amoras, ameixas, jambolão
Petunidina-3-arabinosídeo	cebola roxa
Peonidina-3-glucosídeo	cerejas
Delfinidina-3-diglucosídeo	berinjelas

As mudanças estruturais que ocorrem com a variação do pH, e são responsáveis pelo aparecimento das espécies com colorações diferentes, incluindo o amarelo em meio fortemente alcalino, podem ser explicadas pelo esquema das principais transformações ilustradas na (**Figura 4, página 15**) (TERCİ & ROSSI, 2002). A variabilidade de cores apresentadas por determinadas soluções quando submetidas a valores de pH específicos demonstra que existem outras possibilidades a serem exploradas após determinação de um método adequado para utilização destes indicadores (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

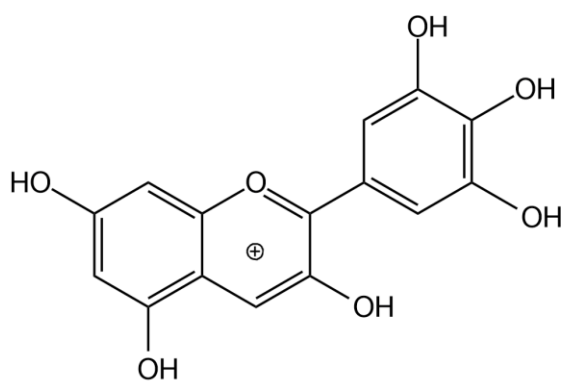
As antocianinas podem ser extraídas a partir de diversos vegetais e plantas naturais como, por exemplo, repolho roxo (*Brassica oleracea*), cebola roxa (*Allium Cepa*) e picão (*Bidens gardneri*), utilizando como solvente álcool etílico comercial (96 °GL) e água (GUIMARÃES *et al.*, 2012; VADIVEL & CHIPKAR, 2016), formando um espectro de cores que possibilitam inferir sobre o pH de uma solução. Entretanto, a estabilidade das antocianinas nessas soluções pode ser comprometida sob certas condições inviabilizando a utilização a longo prazo. O efeito destruidor da luz se faz sentir nas antocianinas presentes no capim gordura, com considerável intensidade, mas também este efeito está estreitamente ligado ao efeito do pH. A temperatura é outro fator importante na estabilidade das antocianinas porque à medida que se submete a solução de antocianinas a uma temperatura superior à 25°C, a sua degradação é maior, mesmo quando complexadas com ácido tânico. Esta degradação é ainda mais acentuada quando se aumenta o pH do meio (LOPES *et al.*, 2007).



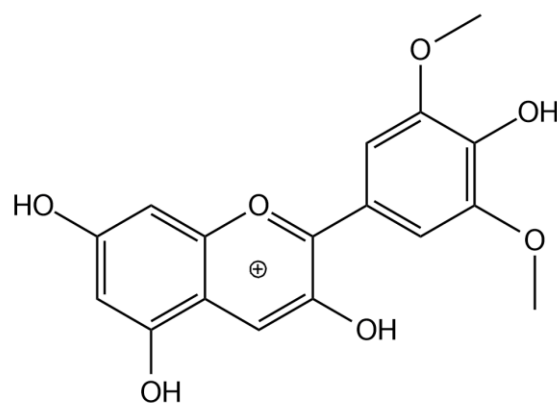
Estrutura genérica das antocianidinas



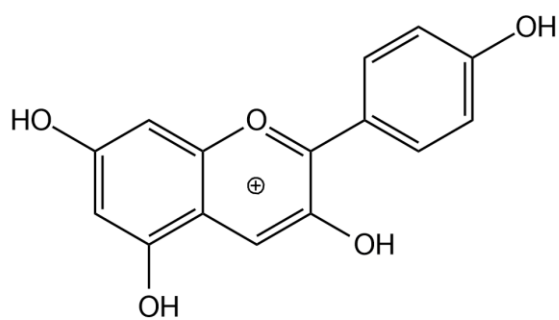
Cianidina



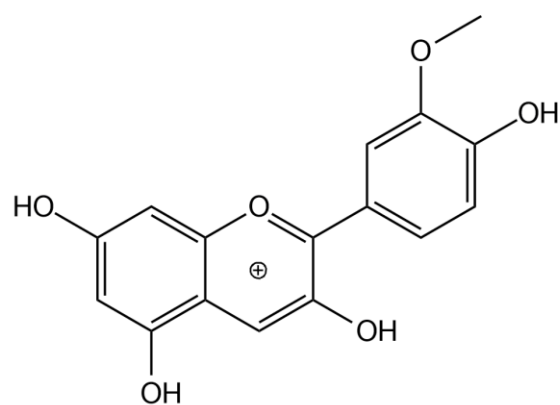
Delfinidina



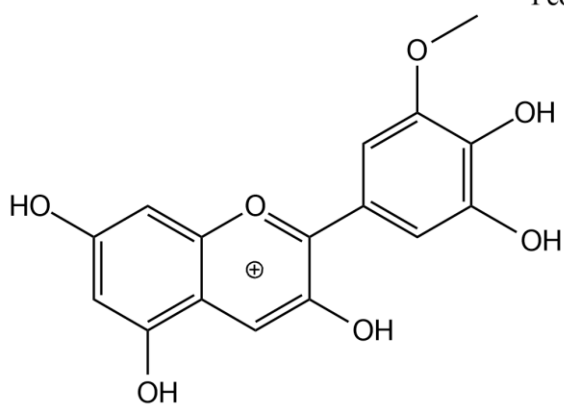
Malvidina



Perladonidina



Peonidina



Petunidina

Figura 3. Estrutura genérica das antocianidinas e suas variações.

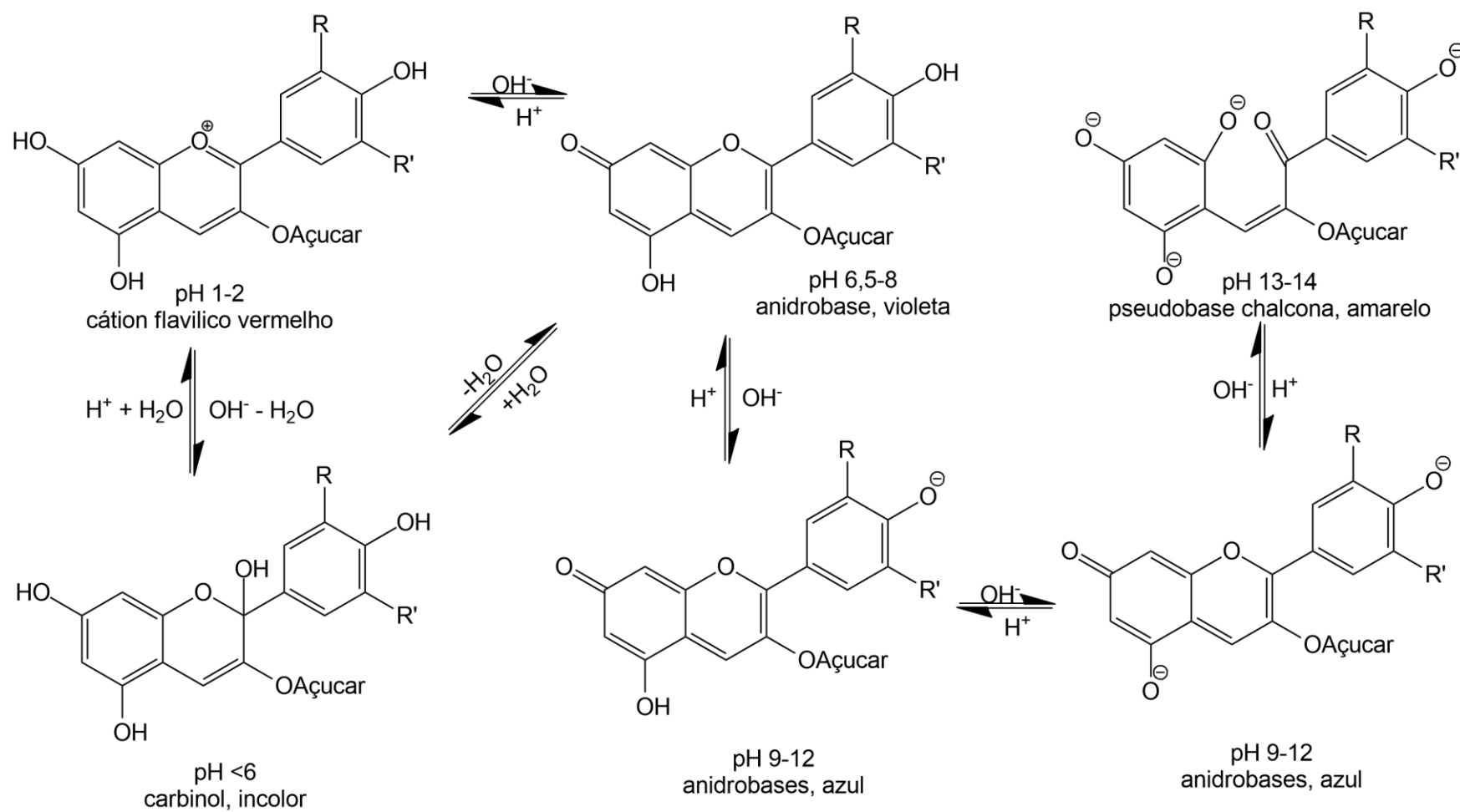


Figura 4. Possíveis mudanças estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH. Adaptado de (TERCI & ROSSI, 2002).

1.2 Alcaloides: betaláínas e suas propriedades

Os alcaloides são compostos nitrogenados de grande diversidade estrutural (SIMÕES *et al.*, 2010). De maneira geral, o átomo de nitrogênio presente nos alcaloides é proveniente de aminoácidos, sendo que, além de aminoácidos, outros precursores podem ser incorporados aos alcaloides, como terpenos ou esteroides (DEWICK, 2002). Dentre as principais funções nos vegetais os alcaloides estão associadas à defesa/proteção da planta, uma vez que em sua grande maioria são tóxicos.

Ainda que os pigmentos mais comuns em Angiospermas sejam pertencentes à classe dos flavonoides, em especial as antocianinas, as betaláínas, alcaloides coloridos, atóxicos e solúveis em água, substituem as antocianinas em todas as famílias de plantas da ordem *Caryophyllales*, exceto nas famílias *Caryophyllaceae* e *Molluginaceae* (GONÇALVES, *et al.*, 2015).

De acordo com GANDIA-HERRERO *et al.* (2010), SCHLIEMANN *et al.* (1999) e HERBACH *et al.* (2006), "As duas classes de betaláínas naturais conhecidas possuem um sistema conjugado 1,7-diazaeptametínico como cromóforo, que se origina de sua biossíntese a partir do ácido betalâmico, um aldeído α,β -insaturado instável (**Figura 5, página 17**). Betaxantinas (Latim: *beta* = beterraba; Grego: *xanthos* = amarelo) são iminas ou sais de imínio com máximo de adsorção (λ_{abs}) entre 460 e 480 nm e que se originam do acoplamento entre o ácido betalâmico e aminoácidos. Por outro lado, os produtos de condensação entre o mesmo ácido e derivados glicosilados da ciclo-DOPA são chamados de betacianinas devido à sua coloração violeta intensa (Grego: *kyaneos* = azul, $\lambda_{\text{abs}} \sim 540$ nm)".

Ainda não é conhecido em qual contexto evolutivo as betaláínas evoluíram, tão pouco o motivo de serem, juntamente com as antocianinas, mutuamente exclusivas, dado que a reconstrução da história evolutiva desses pigmentos ainda não foi elucidada por completo. Existem apenas hipóteses, como a existência de uma via regulatória comum na qual antocianinas atuam como inibidoras da biossíntese de betaláínas, e vice-versa (BROCKINGTON *et al.*, 2011).

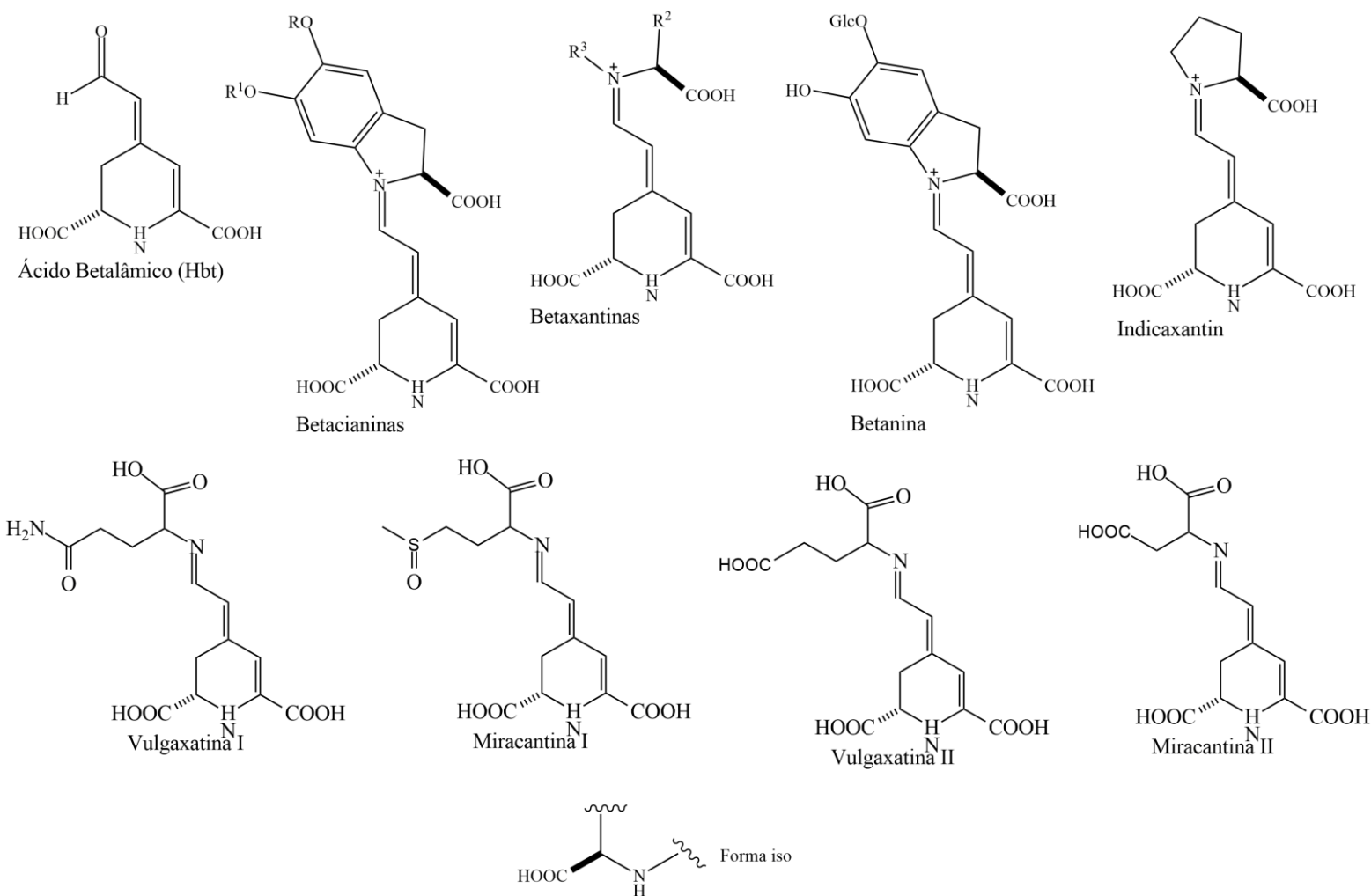


Figura 5. Estrutura geral das betacianinas vermelhas (R e R1 = H ou Glc) e das betaxantinas amarelas (R2 e R3 são grupos característicos de aminoácidos). Estrutura do ácido betalâmico, o precursor comum a todas as betalaínas, e exemplos encontrados na natureza. Adaptado de (GONÇALVES *et al.*, 2015).

1.3 Utilização dos corantes naturais como indicadores de pH

O desenvolvimento de métodos analíticos para qualificação/quantificação tem sido objeto de estudo em diversas áreas da Química e Ciências correlatas. A utilização de substâncias extraídas a partir de produtos naturais como indicadores de pH tem sido bastante relatada na literatura (GUIMARÃES, ALVES, & FILHO, 2012; CANNON & ONG, 2013; VADIVEL & CHIPKAR, 2016). Dentre estes estudos, podemos citar a utilização do extrato de repolho roxo, largamente implementado como indicador natural de pH (CANNON & ONG, 2013). No entanto, diversos fatores influenciam na estabilidades das substâncias naturais indicadoras, promovendo sua oxidação, como por exemplo, interação com a luz e temperatura. Diante deste contexto, a utilização de extratos naturais como indicadores de pH mostra-se como alternativa potencial em métodos analíticos de qualificação/quantificação, desde a etapa de obtenção até a caracterização visual e/ou espectrofotométrica das diferentes formas coloridas que aparecem em função das mudanças de pH do meio. No entanto, considerando-se a baixa estabilidade dos pigmentos naturais em soluções, faz-se necessária avaliação de outras possibilidades de extração e/ou uso, assim como a determinação das melhores formas de armazenamento, promovendo/comprovando, desta forma, a viabilidade da utilização destes pigmentos como indicadores naturais de pH a longo prazo.

Com base nestes pressupostos, o presente projeto objetivou o desenvolvimento de um método para medida de pH de soluções, baseado na utilização dos pigmentos naturais encontrados em vegetais comuns no Brasil como substâncias indicadoras (visuais) de pH, através da confecção de um “*kit* medidor de pH”, a partir de material de baixo custo e fácil acesso. Para tanto, foram avaliadas as melhores formas de extração e impregnação em papel, além das estabilidades dos corantes estudados, assim como os modos de utilização na execução da medida de pH. Os experimentos foram conduzidos de forma a explorar os principais fatores associados à extração, impregnação e conversão de cores associados ao pigmento e valores de pH. A avaliação das respostas foi realizada pelo monitoramento dos papéis de pH alternativos por densitometria computacional (DC), que utiliza o princípio da densitometria tradicional, porém fazendo leituras de densidades luminosas de bandas coloridas através de fotografias digitais.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo do presente estudo é o desenvolvimento de um *kit* medidor pH, criado a partir de material de fácil acesso e baixo custo. Para tanto, foram estudados os melhores métodos de extração e impregnação em papel dos corantes naturais presentes em Repolho roxo (*Brassica oleracea*), berinjela (*Solanum melongena*), beterraba (*Beta vulgaris* L.), Flor de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) e Flor de picão (*Bidens sp.*). Além disso, foram avaliadas as estabilidades dos corantes selecionados para confecção do *kit* de pH, mediante diferentes formas de armazenamento, determinando-se assim, o prazo de validade, os melhores modos de utilização e a aplicabilidade do *kit* em estudos experimentais.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o melhor método de extração dos pigmentos naturais contidos no repolho roxo, berinjela, beterraba, flor de hibisco e flor de picão;
- Estudar e otimizar o método de impregnação em papel dos pigmentos extraídos das referidas matrizes vegetais;
- Avaliar as respostas dos papéis indicadores por análises visuais de mudança de coloração em diferentes valores de pH;
- Determinar as estabilidades dos papéis indicadores de pH por densitometria computacional;
- Confeccionar os *kits* alternativos de pH, com a maior escala de pH possível, sugerindo ainda um método de utilização;
- Avaliar a eficácia dos *kits* alternativos de pH através da comparação com a resposta obtida por potenciômetro equipado com eletrodo de vidro combinado (pHmetro - instrumento utilizado para medida de pH).

3. Material e Métodos

3.1 Equipamentos

O material vegetal foi processado em triturador industrial Inox (LIOTIPO). Para as medidas de pH utilizou-se potenciômetro modelo 913 (METROHM), com eletrodo de vidro combinado (METROHM) contendo solução interna de KCl 3 mol.L⁻¹ saturada com AgCl (METLER TOLEDO). Para secagem do papel impregnado com os indicadores naturais, utilizou-se um secador (ARNO) no modo “ar frio”.

3.2 Reagentes e soluções

Soluções-tampão pH 4,00, 7,00 e 9,00 ± 0,02 (METROHM) foram utilizadas para calibração do medidor de pH. Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol.L⁻¹ (Vetec, Brasil) e ácido clorídrico (HCl) em solução 0,01 mol.L⁻¹ fatorada (Neon, Brasil) foram utilizados no preparo das soluções de pH 2-13. Para preparo da solução de pH 1 foi utilizada solução de HCl 37% (Vetec, Brasil). Água (H₂O) ultra pura (água deionizada com resistividade de 18,2 MΩ.cm) (Millipore, EUA) foi utilizada no preparo das soluções de pH 1-13 e para hidratação das flores de hibisco e picão de modo a facilitar a extração dos respectivos constituintes.

3.3 Material vegetal

Repolho roxo (*Brassica oleracea*), berinjela (*Solanum melongena*) e beterraba (*Beta vulgaris* L.) foram obtidos em feira local no bairro de Piedade (Rio de Janeiro, Brasil). Flor de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) desidratada – Dadinany Produtos Naturais, Lote 3335, Validade: 27/10/2019 – foi obtida em estabelecimento comercial na cidade do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). Flor de picão (*Bidens sp.*) foi coletada em propriedade particular na cidade do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). O material vegetal foi estocado sob refrigeração (-6°C) e ao abrigo de luz.

3.4 Extração dos pigmentos naturais e impregnação em papel de filtro

O material vegetal (folhas de repolho roxo, cascas de berinjela, beterraba e flores de hibisco e picão) foi processado com o auxílio de um triturador e transferido para um pedaço de pano de algodão limpo e seco. Em seguida, o pano foi dobrado e prensado contra o papel de filtro Mellita® Original 103 L:0708171032M VAL:07/08/20 para

transferência do sumo da planta com os pigmentos naturais. Após, o papel de filtro foi secado com pistola de ar frio e o processo repetido por mais quatro vezes.

Observação 1: devido ao baixo teor de umidade das flores de hibisco e picão, foram adicionadas ao material desidratado antes do processamento, massas de água correspondentes à 20% da massa desidratada.

Observação 2: para os estudos preliminares do melhor método de extração/impregnação em papel, foi preparado um extrato aquoso de repolho roxo e beterraba, utilizando a proporção de 1:5 (massa em grama para volume em mililitro) de repolho e água, respectivamente. Este material foi processado com o auxílio de um triturador e, em seguida, filtrado para obtenção do extrato.

3.5 Viabilidade de utilização das matrizes vegetais estudadas como indicadores naturais de pH

Foram avaliadas as mudanças de coloração dos pigmentos presentes nas folhas de repolho roxo, cascas de berinjela, beterraba e flores de hibisco e picão, impregnados em papel de filtro (conforme descrito no **item 3.4**), através da imersão em soluções aquosas de diferentes valores de pH: ácido (pH 1,07), neutro (pH 7,00) e básico (pH 12,9). Os papéis de pH alternativos foram avaliados quanto a mudança de coloração por comparação visual.

3.6 Estabilidade dos papéis indicadores (densitometria computacional)

Foram produzidos três papéis indicadores de pH para cada matriz vegetal, em intervalos de 24 horas, por um total de 15 dias, sendo armazenados à temperatura ambiente e a -6°C , ao abrigo de luz. Após este período, os papéis foram utilizados para medida de pH e fotografados para análise por densitometria. Para tanto, os papéis indicadores preparados com os extratos de repolho roxo, flor de hibisco e beterraba, com área de 4 cm^2 , foram fotografados antes e após utilização para monitoramento de uma solução de $\text{HCl } 0,1\text{ mol.L}^{-1}$ (pH 1,07). As fotografias foram obtidas com câmera digital de 16 megapixels de resolução e, posteriormente analisadas por densitometria computacional - medida da densidade luminosa. O aplicativo *ImageJ* 1.42q (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) foi utilizado para a análise densitométrica.

3.7 Construção da escala de cores em função do pH

Após determinação das melhores matrizes vegetais para utilização como indicadores naturais de pH (repolho roxo, beterraba e flor de hibisco), foram produzidos papéis de pH com os respectivos pigmentos, e realizada a construção das escalas de cores em função do pH (em solução e em papel), para cada matriz. Para tanto, os papéis de pH foram submergidos em 250 μL de solução (pH 1-13), utilizando como placa de toque, blisteres de medicamentos (cortados de 3 em 3 poços). Após, os papéis foram removidos da solução e depositados em placas de vidro. As escalas de cores em função do pH podem ser observadas na **Figura 10** e na **Figura 11** (página 29).

3.8 Validação do método desenvolvido para medidas de pH

Para validação do método de determinação de pH proposto, foram analisadas três soluções desconhecidas por 30 analistas diferentes, através do *kit* medidor de pH alternativo e por medição direta em pHmetro equipado com eletrodo de vidro combinado. As soluções foram rotuladas da seguinte forma: **Solução A** (solução de HCl na concentração de aproximadamente $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$); **Solução B** (solução de NaOH na concentração de aproximadamente $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$); e **Solução C** (Água de torneira).

4. Resultados e Discussão

4.1 Determinação do método de impregnação dos pigmentos em papel de filtro

De modo a definir o melhor método de impregnação dos extratos vegetais no papel de filtro, foram avaliados três procedimentos, utilizando como primeira abordagem, o extrato de repolho roxo: (1). Banhou-se o papel de filtro em extrato aquoso do repolho roxo; (2). Borrifou-se o papel de filtro com o extrato aquoso do repolho roxo e; (3). Pressionou-se o repolho roxo processado contra o papel de filtro através de um pano limpo e seco. Nesta etapa do estudo foram utilizados papéis quadrados com lados medindo 2 cm. Dentre as formas de impregnação, para os procedimentos (1) e (2), supracitados, foi observada a migração dos pigmentos presentes no extrato do repolho roxo para as extremidades dos papéis de filtro (**Figura 6**). Sendo assim, o procedimento (3) mostrou-se qualitativamente mais eficiente, vista homogeneidade da pigmentação do papel, além da menor complexidade do método de impregnação e diminuição do número de etapas, não havendo a necessidade de extração por solvente e, conseqüentemente, de filtração, além da menor dificuldade de secagem dos papéis.



Figura 6. Papéis indicadores produzidos a partir do extrato de repolho roxo, através dos procedimentos de: (a). Banho; (b). Borrifamento e; (c). Compressão.

Sendo assim, o método (3), descrito acima, foi escolhido para continuidade do trabalho.

4.2 Viabilidade de utilização dos extratos vegetais como indicadores de pH

Uma vez definido o método de impregnação dos pigmentos naturais em papel, avaliou-se a viabilidade de utilização dos pigmentos presentes no repolho roxo (*Brassica oleracea*), cascas de berinjela (*Solanum melongena*), beterraba (*Beta vulgaris* L.), flor de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) e flor de picão (*Bidens sp.*). Para tanto,

foram preparados os papéis indicadores com os pigmentos do material vegetal supracitado (**Item 4.1, página 23**), sendo avaliada a mudança de cor em função do pH: ácido (pH 1,07), neutro (pH 7,00) e básico (pH 12,9), para verificação da viabilidade de utilização dos possíveis indicadores na confecção dos papéis indicadores de pH (**Figura 7**).
















	pH		
	Ácido (~1)	Neutro (~7)	Básico (~13)
Flor de Picão			
Repolho roxo			
Flor de hibisco			
Beterraba			
Casca de berinjela			

Figura 7. Avaliação qualitativa dos possíveis indicadores naturais utilizados.

Observou-se que os corantes naturais extraídos do repolho roxo (*Brassica oleracea*), beterraba (*Beta vulgaris* L.) e flor de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) apresentaram diferenciação das cores quando submetidos às soluções com diferentes valores de pH, enquanto que os extraídos da casca de berinjela (*Solanum melongena*) e flor de picão (*Bidens sp.*) não apresentaram mudança na coloração de forma significativa na faixa de pH ensaiada. Considerando esses resultados, os pigmentos presentes no repolho roxo, beterraba e flor de hibisco foram selecionados como os melhores indicadores para observação da variação de pH.

Devido às diferentes colorações apresentadas pelos três extratos selecionados (indicadores naturais), quando considerado um único valor de pH, sugeriu-se a confecção de um *kit* medidor de pH que utilizasse os três em conjunto, obtendo-se assim, medidas mais exatas.

4.3 Estudo de estabilidade por análise densitométrica

Após definição dos insumos naturais e do método de impregnação em papel, foram realizados testes de estabilidade de forma a determinar o período adequado de estocagem dos papéis indicadores, assim como a melhor forma de armazenamento. Para realização deste ensaio, foram preparados papéis indicadores, em triplicata, diariamente, durante um período de 15 dias, a partir do repolho roxo, beterraba e flor de hibisco. Os papéis foram armazenados sob duas condições diferentes: 1) à temperatura ambiente e sob o abrigo de luz; 2) a temperatura de -6°C e sob o abrigo de luz. Ao término de 15 dias, os papéis indicadores foram qualitativamente avaliados, sendo observada uma mudança brusca na coloração dos que foram armazenados à temperatura ambiente, sugerindo uma possível oxidação das substâncias presentes nas matrizes vegetais em estudo, diferentemente, do observado para os papéis armazenados a -6°C . Sendo assim, estes últimos foram submetidos a uma análise de densitometria computacional utilizando o programa *ImageJ bundled with 64-bit Java 1.8.0_112* (National Institutes of Health, Bethesda, EUA), de forma a avaliar quantitativamente o grau de estabilidade dos pigmentos neles impregnados. Com isso, esta análise teve como objetivo a observação de possível tendência na degradação dos indicadores naturais quando impregnadas no papel de filtro durante o período de 15 dias.

Para a análise densitométrica, os papéis de 4 cm^2 impregnados com os insumos vegetais foram dispostos em intervalos regulares em um fundo branco. Após, os papéis indicadores foram fotografados antes e após aplicação de solução de $\text{HCl } 0,1\text{ mol.L}^{-1}$ (pH 1,07). As fotografias foram obtidas com câmera digital de 16 megaÁreas de resolução e, posteriormente analisadas pelo aplicativo *ImageJ 1.42q*, gerando dados em termos de áreas, proporcionais à ausência de densidade luminosa, em cada papel, de forma que esse valor representasse a intensidade da cor do papel, e consequentemente, a qualificação/quantificação dos pigmentos presentes. O esquema mostrado na **Figura 8 (página 26)**, é representativo da análise densitométrica realizada.

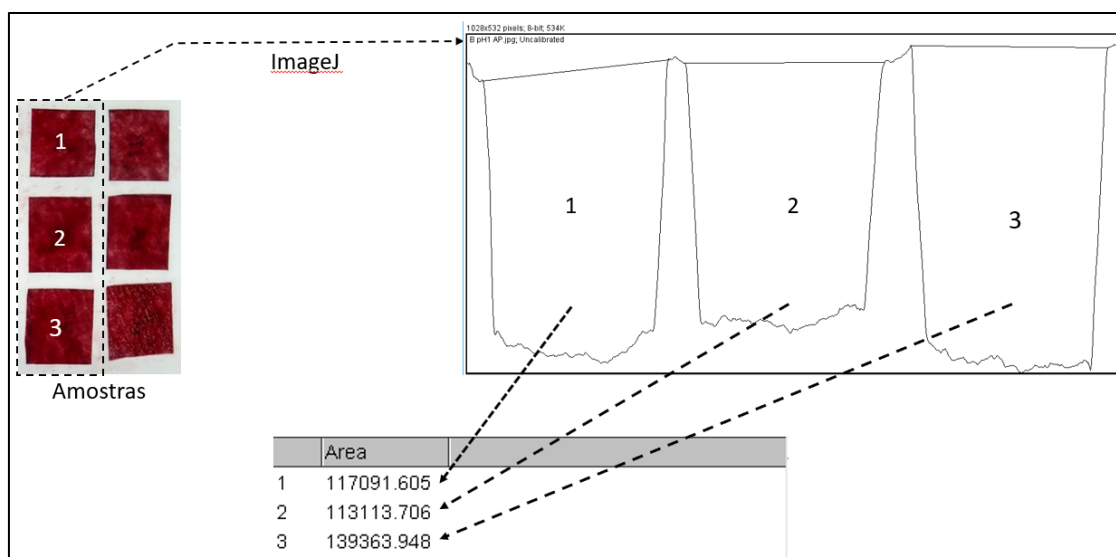


Figura 8. Esquema representativo da análise densitométrica

Os resultados obtidos encontram-se descritos nas **Tabelas A1-A6 (Anexo A; página 37)**. Foi realizada ainda, a análise estatística destes dados de forma a determinar valores discrepantes, “*outliers*”, consequentes da análise densitométrica (**Figuras B1-B6; Anexo B, página 43**). Os valores considerados discrepantes pela análise estatística foram excluídos do cálculo das médias.

Os resultados obtidos (por dia) foram normalizados em função da maior média obtida (considerado como 100% de eficiência, vista maior quantidade de pigmentos viáveis). A partir desses resultados, foram constituídos os histogramas mostrados na **Figura 9 (página 27)**, de modo a detectar possíveis tendências de degradação.

Das três matrizes utilizadas no estudo, o repolho roxo mostrou-se, pela análise densitométrica, a mais sensível quanto às condições de armazenamento, visto menores valores de eficiência ao longo do prazo de 15 dias. No entanto, estes resultados não comprometeram a viabilidade de utilização do repolho roxo como base para produção do papel indicador, uma vez que após utilização para monitoramento do pH da solução de HCl, a maior parte dos papéis indicadores apresentou eficiência acima de 70%.

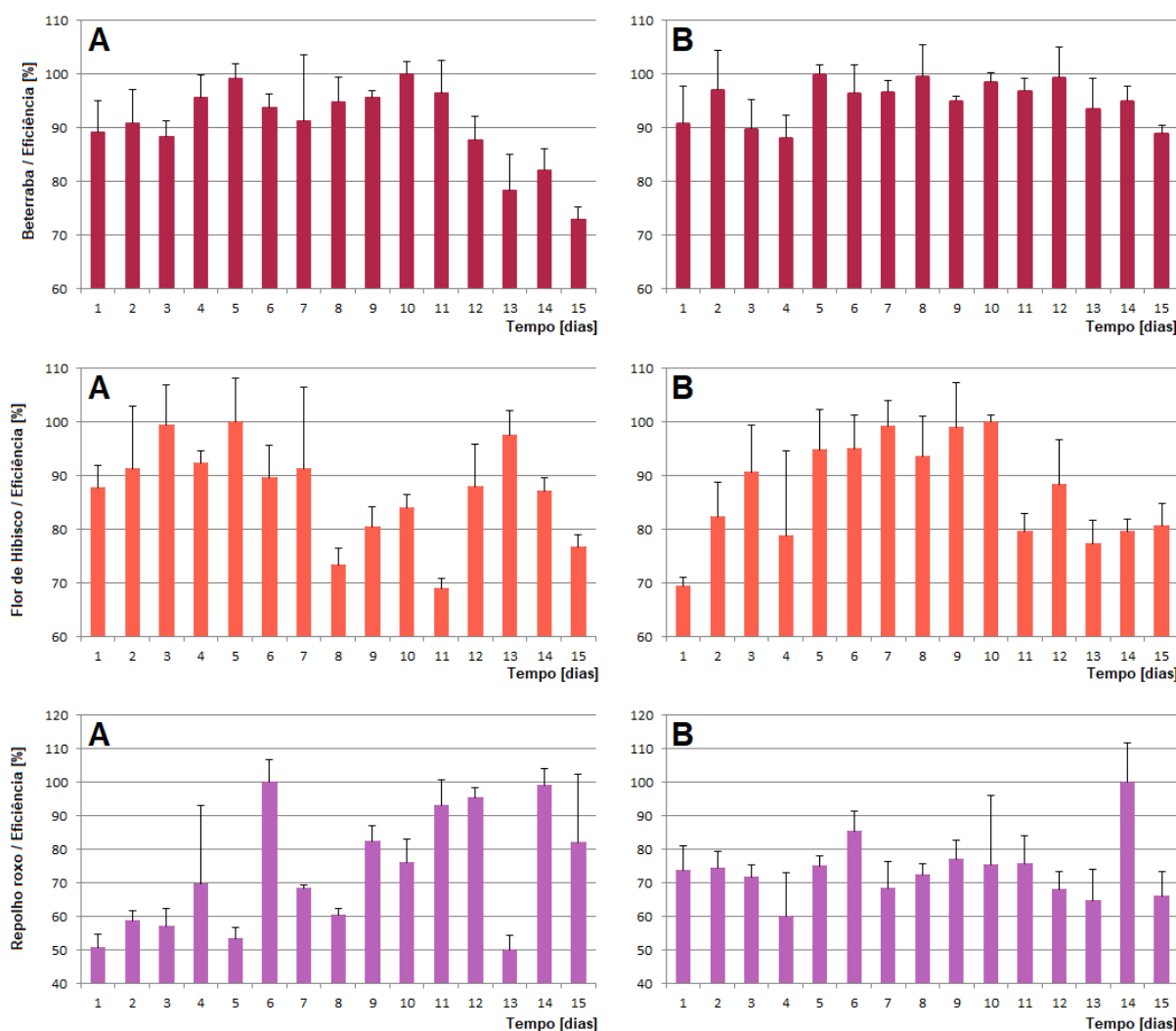


Figura 9. Análise densitométrica dos papéis indicadores produzidos com os pigmentos de beterraba, flor de hibisco e repolho roxo durante o período de 15 dias. A. Antes e; B. Após a aplicação de solução pH 1.

De maneira geral não foi observada tendência de degradação dos pigmentos obtidos a partir das matrizes vegetais estudadas impregnadas em papel, com exceção da beterraba, cuja eficiência a partir do 12º dia decaiu progressivamente. No entanto, este resultado não inviabilizou a utilização desta matriz até o prazo de 15 dias, visto que as eficiências mantiveram-se acima de 70% antes da utilização do papel, ocorrendo um acréscimo da eficiência após mudança de coloração oriunda da aplicação da solução de HCl (pH 1).

A variação nos resultados pode ser atribuída a fatores naturais, como por exemplo, proporção entre massa de planta e quantidade de pigmento, uma vez que seria inviável a utilização de um único exemplar da matriz vegetal no período de 15 dias.

Sendo assim, os resultados da análise densitométrica computacional sugeriram que os papéis indicadores produzidos com repolho roxo, beterraba e flor de hibisco, são eficientes quanto o monitoramento do pH de soluções, com um prazo de validade de até 15 dias, quando estocados sob refrigeração ($\leq - 6^{\circ}\text{C}$) e ao abrigo da luz.

4.4 Construção da escala de cores em função do pH

De modo a construir uma escala de cores para cada tipo de papel indicador (**R** – papel de filtro impregnado com extrato de repolho roxo; **B** – beterraba; e **H** – flor de hibisco), foram preparadas soluções com diferentes valores de pH, variando-se de pH 1 a 13, conforme **Tabela 2**.

Tabela 2. Resultados de pH nominais e exatos das soluções utilizadas na construção da escala de cores.

	pH nominal	pH exato*
Solução 1	1	1,07
Solução 2	2	2,01
Solução 3	3	3,05
Solução 4	4	4,00
Solução 5	5	4,92
Solução 6	6	6,01
Solução 7	7	7,00
Solução 8	8	7,92
Solução 9	9	9,00
Solução 10	10	9,99
Solução 11	11	11,02
Solução 12	12	12,00
Solução 13	13	12,90

*valores de pH determinados por medida direta em pHmetro.

Foram utilizados ainda, blisteres de medicamento cortados de 3 em 3 poços, como placa de toque. A cada poço foi adicionado um papel de pH de cada matriz vegetal (**R**, **B** e **H**), sendo adicionados, posteriormente, 250 μL de cada solução (soluções 1-13, **Tabela 2**). Em seguida, os papéis de pH foram retirados e depositados em placas de vidro, na mesma disposição das soluções das placas de toque, sendo as escalas de cores em função do pH, assim definidas em solução e em papel.

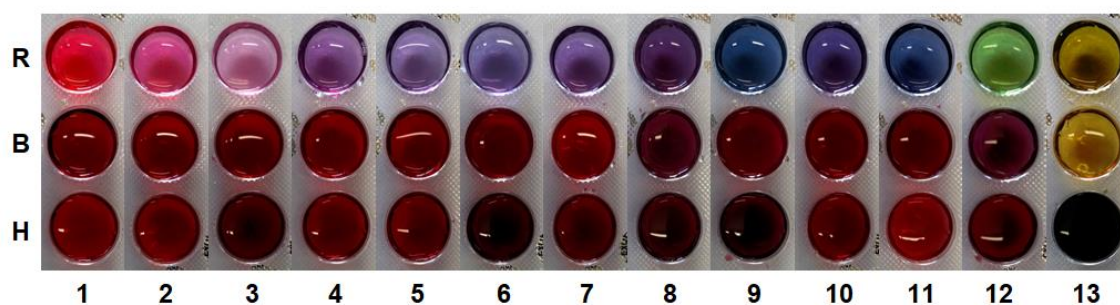


Figura 10. Escala de cores em solução em função do pH (pH 1-13). Papel de filtro impregnado com extrato de R - repolho roxo; B- beterraba; H- flor de hibisco.

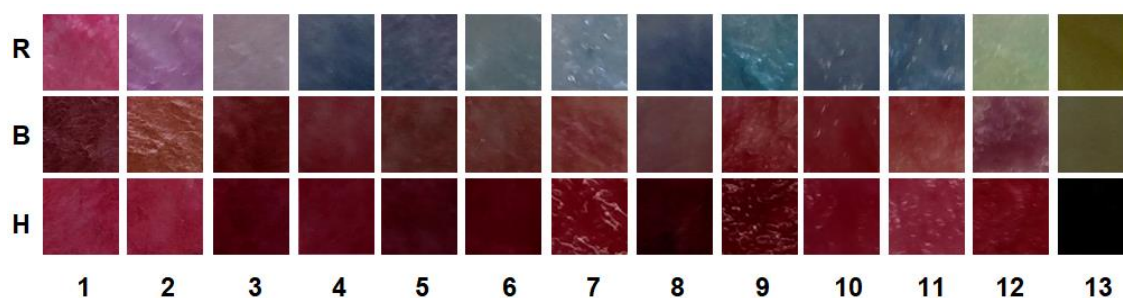


Figura 11. Escala de cores em papel em função do pH (pH 1-13). Papel de filtro impregnado com extrato de R - repolho roxo; B – beterraba; e H – flor de hibisco.

4.5 Confeção do *kit* alternativo medidor de pH e protocolo de utilização

Uma vez definidas as escalas de cores em função do pH para cada matriz vegetal estudada, estruturou-se um *kit* alternativo medidor de pH, ou seja, de baixo custo e fácil acesso, delineando-se ainda o método de utilização, conforme descrito a seguir:

Conteúdo do *kit* medidor de pH (para 100 medidas) (ver o esquema mostrado na Figura 12, página 30):

- 100 papéis de pH impregnados com extrato de beterraba;
- 100 papéis de pH impregnados com extrato de flor de hibisco;
- 100 papéis de pH impregnados com extrato de repolho roxo;
- 2 placas de toque de 3 poços (fitas medidoras de pH) (construídas com blister de medicamento reciclada);
- Escalas de cores em função do pH em solução e em papel (mostradas na **Figura 10** e na **Figura 11**);
- 1 pinça.

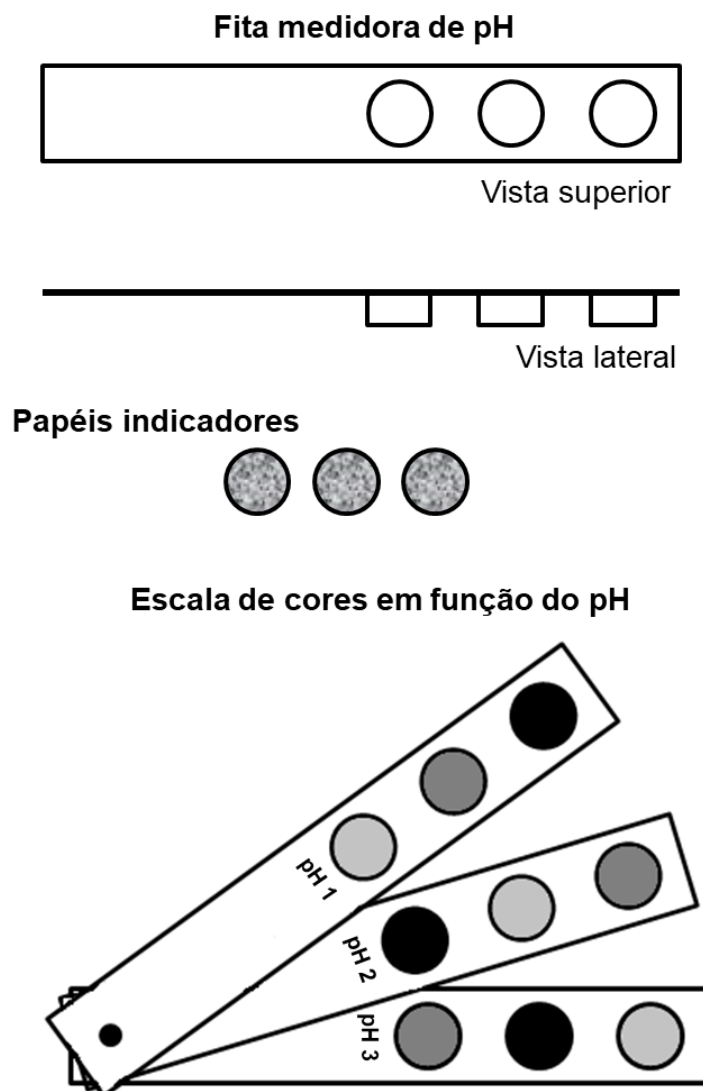


Figura 12. Conteúdo do *kit* medidor de pH

Método de análise:

- Colocar um disco de papel indicador de cada extrato natural (repolho roxo, beterraba e flor de hibisco) em cada poço da fita medidora de pH. É aconselhável utilizar a ordem da escala de cores em função do pH.
- Adicionar 3 gotas da solução da qual se deseja determinar o pH.
- Agitar cuidadosamente e remover com a pinça o disco indicador.
- Comparar as cores obtidas nos poços da fita medidora de pH com a escala de cores em função do pH (das soluções e dos papéis).

4.6 Estudo prático de utilização do *kit* medidor de pH - Teste cego

Após montagem do *kit* de análise, foi realizado um “teste cego” para observar a efetividade de utilização do mesmo em um ambiente realista de trabalho. Para tanto, foram preparadas três soluções com diferentes valores de pH:

- **Solução A** – pH 1,72 – solução de HCl na concentração de 0,1 mol.L⁻¹;
- **Solução B** – pH 12,71 – solução de NaOH na concentração de 0,1 mol.L⁻¹;
- **Solução C** – pH 6,33 – Água de Torneira;

Foi solicitado a 30 analistas que determinassem os valores de pH de cada solução (A, B e C) utilizando o *kit* conforme método de análise descrito no **Item 4.5 (Página 29)**. Os resultados obtidos foram anotados e estão dispostos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Valores de pH encontrados para as soluções A, B e C, em “teste cego” através da utilização dos *kits* de pH alternativos.

Analista	Solução A* pH 1,72***	Solução B* pH 12,71***	Solução C** pH 6,33***
01	2	13	6
02	2	13	6
03	2	14	6
04	2	14	6
05	3	12	8
06	3	12	8
07	3	12	8
08	3	12	8
09	2	13	5
10	2	13	5
11	3	12	6
12	3	12	6
13	3	12	6
14	3	12	6
15	2	13	6
16	2	13	6
17	2	13	6
18	2	13	6

*Soluções A e B: HCl e NaOH na concentração de aproximadamente 0,1 mol.L⁻¹, respectivamente; **Solução C: água de torneira; ***valores de pH determinados por medida direta em pHmetro.

Tabela 3. Valores de pH encontrados para as soluções A, B e C, em “teste cego” através da utilização dos kits de pH alternativos (continuação).

Analista	Solução A* pH 1,72***	Solução B* pH 12,71***	Solução C** pH 6,33***
19	1	13	5
20	1	13	5
21	3	13	6
22	3	13	6
23	1	13	6
24	1	13	6
25	1	13	6
26	1	13	6
27	1	13	6
28	1	13	6
29	1	13	6
30	2	12	3
Média ± DP	2 ± 1	13 ± 1	6 ± 1

DP: desvio padrão; *Soluções A e B: HCl e NaOH na concentração de aproximadamente 0,1 mols.L⁻¹, respectivamente; **Solução C: água de torneira; ***valores de pH determinados por medida direta em pHmetro.

A similaridade entre os valores de pH determinados pelos analistas para as soluções A, B e C, e os valores de pH determinados instrumentalmente (pHmetro), sugeriu a elevada eficiência do *kit* medidor de pH ao que se propõe, validando o método de utilização proposto no **item 4.5 (página 29)**.

4.7 Possibilidades de aplicação do *kit* alternativo medidor de pH

Considerando os resultados descritos acima, o *kit* medidor de pH alternativo possui aplicabilidade, seguindo o procedimento sugerido e validado, em diversas situações onde sejam necessárias verificações de acidez/basicidade de soluções, como por exemplo, em aulas práticas de química analítica. Em estudo recente do grupo de pesquisa, os papéis de filtro impregnados com extrato de repolho roxo foram implementados em método de detecção de cetamina como adulterante em vodkas (TOSTES *et al.*, 2018).

5. Conclusão

O eixo do presente trabalho envolveu o desenvolvimento de um *kit* alternativo para medidas de pH em solução, visando a utilização de material de baixo custo efetivo e de fácil acesso na sua construção, e sendo baseado na utilização de indicadores naturais presentes em matrizes vegetais comuns no Brasil. Para tanto, foram explorados os parâmetros importantes para extração e conservação dos pigmentos presentes em repolho roxo (*Brassica oleracea*), berinjela (*Solanum melongena*), beterraba (*Beta vulgaris* L.), flor de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) e flor de picão (*Bidens sp.*). De acordo com os resultados obtidos para verificação das mudanças de coloração dos pigmentos naturais presentes nas matrizes supracitadas, em função do pH da solução, verificou-se a viabilidade de utilização dos pigmentos presentes nos extratos de repolho roxo, beterraba e flores de hibisco, sendo estas matrizes vegetais escolhidas para a continuidade do trabalho.

Dentre os métodos utilizados, a impregnação em papel de filtro através da compressão do material vegetal macerado (e hidratado no caso da flor de hibisco) foi o método escolhido para confecção de papéis indicadores, cujo prazo de validade foi estimado em até 15 dias por densitometria computacional, sendo as condições de armazenamento: temperatura de -6°C e ausência de luz.

O *kit* proposto foi constituído pelos referidos papéis indicadores, blisteres de medicamento reciclados (cortados de 3 em 3 poços para utilização como placas de toque) e escalas de cores em função do pH (em solução e em papel). A validação do método de determinação de pH em solução através da utilização do *kit* proposto neste estudo, foi realizada por comparação dos valores de pH de três soluções analisadas por potenciômetro equipado com eletrodo de vidro combinado (pHmetro) com os valores médios obtidos pelo monitoramento das referidas soluções por 30 analistas através da utilização do *kit* medidor de pH. Os valores encontrados foram: 2, 13 e 6 (respostas dos analistas); 1,72, 12,71 e 6,33 (respostas obtidas instrumentalmente).

6. Perspectivas

O presente estudo possui ainda como perspectivas, as seguintes etapas de otimização do método de determinação de pH de soluções através do *kit* alternativo:

- 1) Implementação de outras matrizes vegetais, como por exemplo, água de feijão preto, cuja escala de cores em função do pH é bastante diversificada;
- 2) Implementação de uma etapa de confirmação do pH no método proposto, através da utilização de soluções tampão pH 1-13;
- 3) Verificação da possibilidade do aumento do prazo de validade dos papéis indicadores por densitometria computacional.

7 Referências bibliográficas

- ALKEMA, S.; & SEAGER, S. The chemical pigments of plants. *Journal of Chemical Education*, v. 59, p. 183, 1982.
- BACCAN, N.; ANDRADE, J.; GODINHO, O.; & BARONE, J. S. (1979). **Química Analítica Quantitativa Elementar**, 2ª ed., Ed. Unicamp: Campinas, 46.
- BROCKINGTON, S. F.; WALKER, R. H.; GLOVER, B. J.; SSOLTIS, P. S.; & SOLTIS, D. E. Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytologist*, v. 190, p. 854-864, 2011.
- CANNON, M. B.; ONG, K. L. Quantitative use of red cabbage to measure pH through spectrophotometry: A laboratory experience for general chemistry students. *Using Food To Stimulate Interest in the Chemistry Classroom*, v.1130, p. 129-139, 2013.
- DEWICK, P. M. (2002). **Medicinal natural products: A biosynthetic approach.**, 2ª ed., Inglaterra, 515.
- FOSTER, M. Plant pigments as acid-base indicators - An exercise for the junior high school. *Journal of Chemical Education*, v. 55, p.107, 1978.
- GANDIA-HERRERO, F.; ESCRIBANO, J.; & GARCIA-CARMONA, F. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*, v. 232, p. 449-460, 2010.
- GONÇALVES, L.; MARCATO, A.; RODRIGUES, A.; PAGANO, A.; FREITAS, B.; MACHADO, C.; BASTOS, E. Betalaínas das cores das beterrabas à fluorescência das flores. *Revista Virtual de Química*, n. 7, v. 1, p. 292-309, 2015.
- GUIMARÃES, W.; ALVES, M. I.; & FILHO, N. R. Antocianinas em extratos de vegetais: Aplicações em titulação ácido base e identificação via cromatografia líquida/espectrometria de massas. *Química Nova* v. 3, nº 8, p. 1673-1679, 2012.
- HAVSTEEN, B. H. Flavonoids: a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, v. 32, p. 1141-1148, 1983.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, p. 167-202, 2002.
- HERBACH, K.; STINTZING, F.; & CARLE, R. Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, R41-R50, 2006.
- LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G.; & QUADRI, M. B. Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *R. Bras Agrocência*, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.
- MARIOT, A.; HENRIQUES, A. T.; LAPA, A. J.; HEIZMANN, B. M.; IRGANG, B. E.; AL, E. A. (2000). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul/Florianópolis, Santa Catarina.

SCHLIEMANN, W.; KOBAYASHI, N.; & STRACK, D. The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiology*, n. 119, p. 1217-1232, 1999.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; & PETROVICK, P. R. (2010). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. 1. reimp.

TERCI, D. B.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 648-688, 2002.

TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P.; HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; & MABRY, H. (1975) **The Flavonoids**, New York: Academic Press.

TOSTES, A. S.; PINTO, E. S.; BARBOSA, J. S. **Utilização de indicadores sintético e natural de pH para detecção de cetamina em vodka**. Trabalho Final de curso. Instituto Federal Fluminense, Itaperuna, Rio de Janeiro. 2018.

VADIVEL, E.; & CHIPKAR, S. D. Eco-friendly natural acid-base indicator properties of four flowers plants from western chats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 6, p. 250-252, 2016.

VERGARA, C.; VON BAER, D.; HERMOSÍN, R. A.; HITSCHFELD, M. A.; CASTILLO, N.; & MADONES, C. Anthocyanins that confer characteristic color to red copihue flowers (*Lapageria rosea*). *Journal of the Chilean Chemical Society*. v. 54, n. 2, p. 194-197, 2009.

Anexo A - Resultados da análise densitométrica

Tabela A1. Resultados para os papéis indicadores de beterraba durante o período de 15 dias.

Dias	Resultado 1 (Área)	Resultado 2 (Área)	Resultado 3 (Área)	Média
1	86974927	98736685	91558442	92423351
2	86598271	96820492	98737149	94051971
3	94612635	88508229	91210492	91443785
4	94974513	99074350	103432534	99160466
5	101772836	106014208	100764128	102850391
6	100181714	95743321	95707836	97210957
7	97837321	80386915	105250655	94491630
8	92531099	101021191	100804798	98119029
9	99507191	100056584	97589404	99051060
10	103081643	106255350	101335271	103557421
11	94292200	106707551	98752078	99917276
12	87948765	96032078	88686229	90886024
13	75190007	88686685	79586200	81154297
14	85337279	88906229	80928593	95057367
15	77260401	69505522 ¹	73731898	75496150

¹*Outlier* detectado e excluído do cálculo da média conforme análise estatística realizada por boxplot com intervalo de 95% de confiança demonstrada na Figura B1 do Anexo B.

Tabela A2. Resultados para os papéis indicadores de flor de hibisco durante o período de 15 dias.

Dias	Resultado 1 (Área)	Resultado 2 (Área)	Resultado 3 (Área)	Média
1	91214693	93118179	85172966	89835279
2	105789886	93694966	81148765	93344539
3	95890856	98779028	110386898	101685594
4	124476576 ²	92735513	96089626	94412569
5	111452768	100577655	94764848	102265090
6	98614664	89276785	86796706	91563718
7	99343170	105100768	75623350	93355762
8	74859869	71903534	78342454	75035285
9	78669442	82082806	86224877	82325708
10	88736647	85080969	83998898	85938838
11	68973576	70059806	72789747	70607710
12	80792794	94366057	94808350	89989067
13	105151635	97703635	96608706	99821325
14	86806016	88723815	91796179	89108670
15	80548513	75902212	78650007	78366910

²*Outlier* detectado e excluído do cálculo da média conforme análise estatística realizada por boxplot com intervalo de 95% de confiança demonstrada na Figura B2 do Anexo B.

TabelaA3. Resultados para os papéis indicadores de repolho durante o período de 15 dias.

Dias	Resultado 1 (Área)	Resultado 2 (Área)	Resultado 3 (Área)	Média
1	44531345	44129283	50597304	46419311
2	50886262	56461182	54202768	53850071
3	57947990	49152161	49939626	52346592
4	63593111	85360278	42441161	63798183
5	46153940	48030768	52081960	48755556
6	98617664	89276785	86796706	91563718
7	63569525	62445739	61854082	62623115
8	56700182	55826475	53313505	55280054
9	79993960	74813132	71719354	75508815
10	75950597	63296798	70013404	6753600
11	92955839	78754434	83758706	85156326
12	87145019	90140718	84746676	87344138
13	47214354	49022960	41233454	45823589
14	85374224	94613567	91750475	90579422
15	62184061	66223990	96618395	75008815

Tabela A4. Resultados para os papéis indicadores de beterraba durante o período de 15 dias (em solução pH 1).

Dias	Resultado 1 (Área)	Resultado 2 (Área)	Resultado 3 (Área)	Média
1	95060141	109784584	107024860	103956528
2	101830635	113803706	117737827	1111124056
3	109849597	98027090	100464475	102780387
4	95998354	100353404	105788375	100713378
5	114505019	116261342	11282706	114349689
6	116065614	110860090	104303212	11040939
7	108931614	85703714 ³	112196413	110564014
8	106895291	119785383	115253233	113977969
9	108120534	108505777	1097552990	108793100
10	111940602	114905463	111349241	112731769
11	108565229	113821258	110127744	110838077
12	115911513	118758827	106285948	113652096
13	106321836	113708111	101299555	107109834
14	107696685	112125735	106263572	108695331
15	102336836	99652614	103049639	101679714

³*Outlier* detectado e excluído do cálculo da média conforme análise estatística realizada por boxplot com intervalo de 95% de confiança demonstrada na Figura B4 do Anexo B.

Tabela A5. Resultados para os papéis indicadores de flor de hibisco durante o período de 15 dias (em solução pH 1).

Dias	Resultado 1 (Área)	Resultado 2 (Área)	Resultado 3 (Área)	Média
1	79800739	81984312	83428555	81737689
2	105606659	91602919	93850019	97019866
3	105362617	97395141	117660718	106806159
4	113876659	79224111	85538374	92879715
5	120947324	103417798	110915496	111760206
6	116994839	103343040	115105839	111814573
7	119867475	120386940	110509798	116921404
8	112274931	100409676	117675576	110120061
9	125598496	105920342	118033756	116517532
10	117701496	116172769	119344931	117739731
11	89317283	96205718	95664759	93729253
12	93367747	112525869	106274969	104056195
13	93527475	94656454	85132182	91105370
14	92275505	96984070	91931940	93730505
15	97974446	97667241	89435889	95025859

Tabela A6. Resultados para os papéis indicadores de repolho durante o período de 15 dias (em solução pH 1).

Dias	Resultado 1 (Área)	Resultado 2 (Área)	Resultado 3 (Área)	Média
1	52115538	50816337	60367011	54432962
2	50643032	58253780	55331546	54742786
3	52501538	50277960	55784387	52854628
4	55155792	37932567	39696567	44261642
5	53176579	54953588	57665395	55265187
6	60832194	68087224	60135813	63018410
7	43768922	55142851	52012943	50308239
8	50188467	54434253	55093973	53238898
9	61358801	53506283	55532132	56799072
10	73122529	47068626	46696449	55629201
11	75704006 ⁴	60215567	51375441	55795504
12	79387514 ⁴	52910165	47370408	50140286
13	52602123	42668860	32727647 ⁴	47535491
14	79744006	67616203	176173378 ⁴	73680104
15	52465910	44920588	203096621 ⁴	48693249

⁴**Outliers detectados e excluídos do cálculo das médias correspondentes conforme análise estatística realizada por boxplot com intervalo de 95% de confiança demonstrada na Figura B6 do Anexo B.**

Anexo B – Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa Minitab Versão 17.0. Através do “Summary Report” pode ser observado o histograma, gráfico de valores individuais e boxplot dos dados para determinar se os dados seguem uma distribuição normal e obter intervalos de confiança.

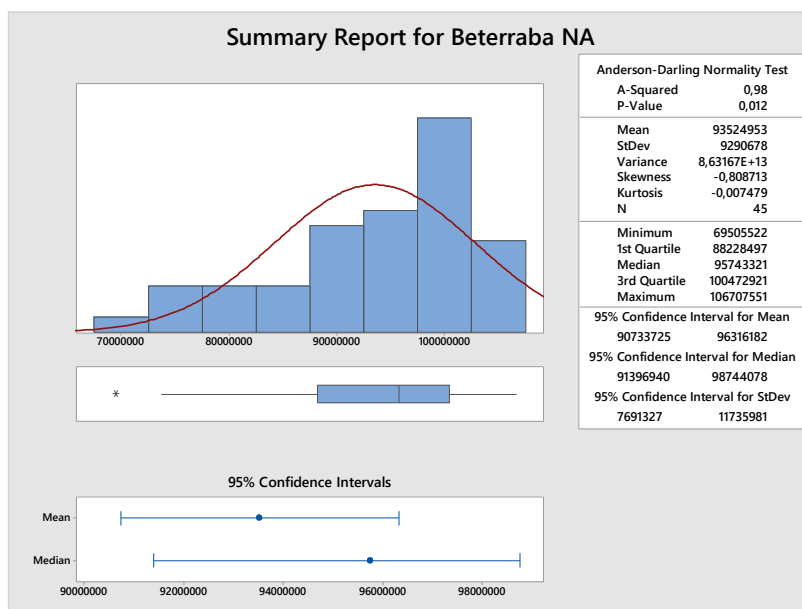


Figura B1. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados da beterraba.

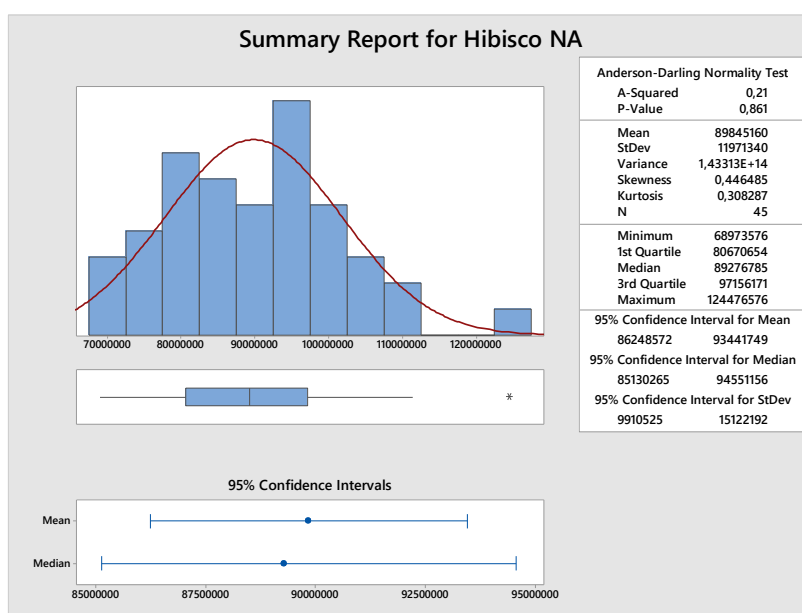


Figura B2. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados da flor de hibisco.

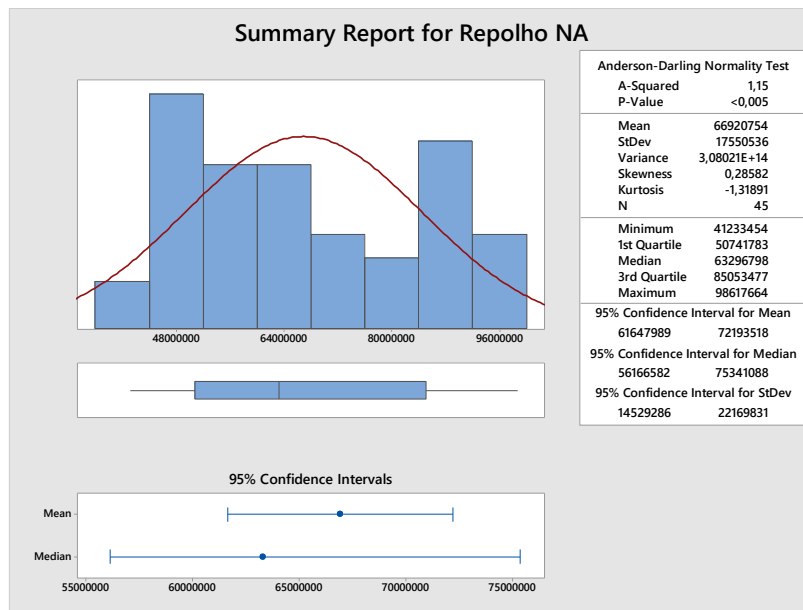


Figura B3. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados do repolho roxo.

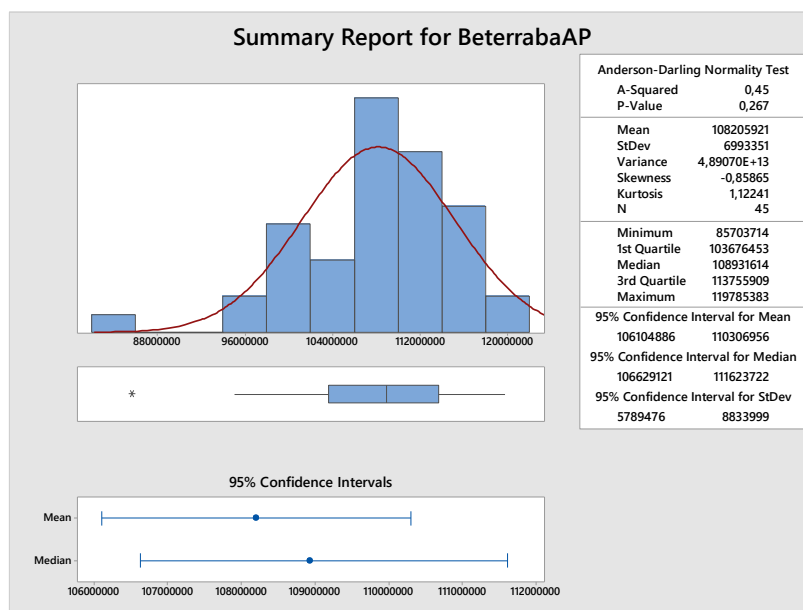


Figura B4. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados da beterraba impregnados com pH 1.

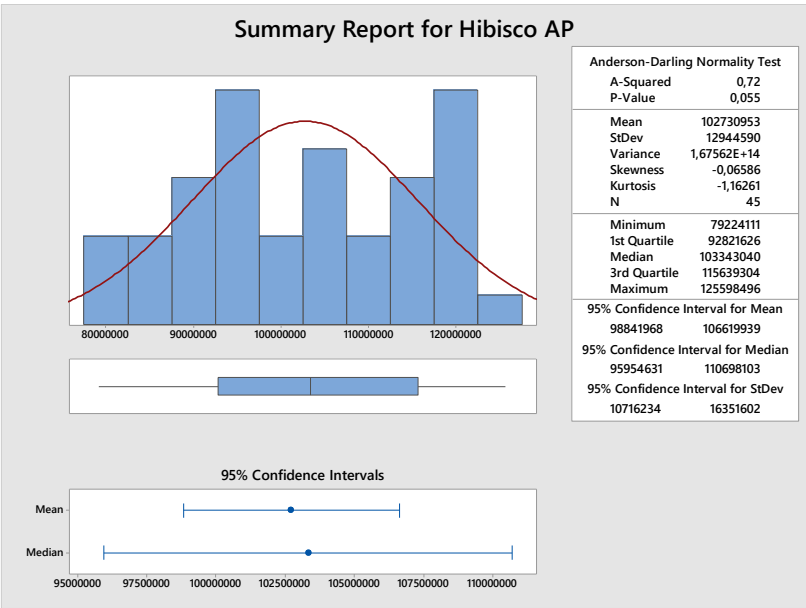


Figura B5. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados da flor de hibisco impregnados com pH 1.

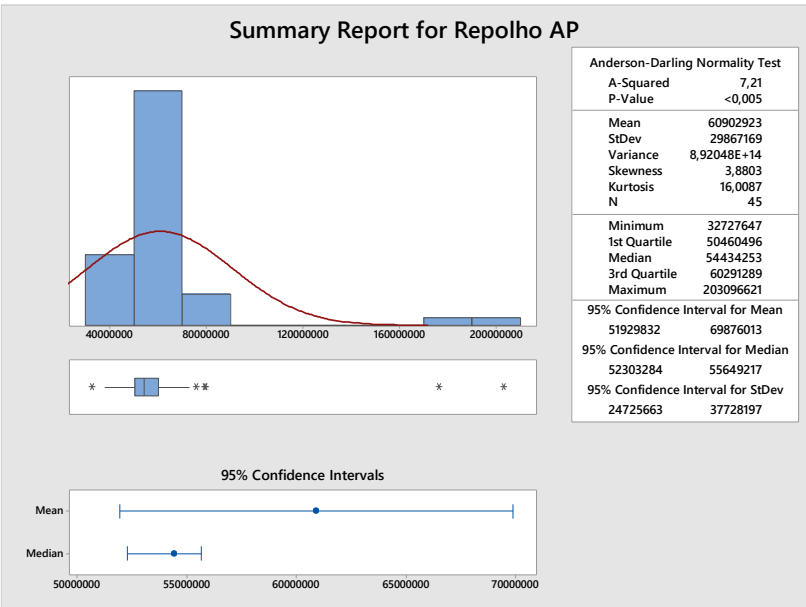


Figura B6. Análise estatística dos resultados de densitometria para os papéis indicadores derivados do repolho roxo impregnados com pH 1.